

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

10/531463

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年9月16日 (16.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/078188 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 35/74, 31/716, 7/48, 7/00, A61P 1/10, 37/04, 17/16 (74) 代理人: 松井 茂 (MATSUI, Shigeru); 〒1040061 東京都中央区銀座八丁目 1 6 番 5 号 銀座森ビル 2 階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/002780
- (22) 国際出願日: 2004年3月4日 (04.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2003-061382 2003年3月7日 (07.03.2003) JP
特願2003-061379 2003年3月7日 (07.03.2003) JP
特願2004-028965 2004年2月5日 (05.02.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社アウレオ (AUREO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1080071 東京都港区白金台 2 丁目 7 番地 7 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 守屋 直幸 (MORIYA, Naoyuki) [JP/JP]; 〒1080071 東京都港区白金台 2 丁目 7 番地 7 号株式会社アウレオ内 Tokyo (JP). 守屋 ▲祐▼生子 (MORIYA, Yukiko) [JP/JP]; 〒1080071 東京都港区白金台 2 丁目 7 番地 7 号株式会社アウレオ内 Tokyo (JP). 鈴木 健司 (SUZUKI, Kenji) [JP/JP]; 〒1730012 東京都板橋区大和町 1 7 - 8 - 4 0 3 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: COMPOSITION CONTAINING β -GLUCAN AND CONSTIPATION-RELIEVING DRUG, IMMUNOPOTENTIATOR AND SKIN MOISTENING AGENT USING THE COMPOSITION

(54) 発明の名称: β -グルカン含有組成物及び該組成物を利用した便秘改善剤、免疫賦活剤並びに皮膚用保湿剤

(57) Abstract: It is intended to provide a composition containing β -glucan in which the physiologically active effects of β -1,3-1,6-glucan contained in the culture medium of a bacterium belonging to the genus *Aureobacidium* sp. are further enhanced, and a constipation-relieving drug, an immunopotentiator and a skin moistening agent using the composition. A composition containing β -glucan, which contains a culture medium containing β -1,3-1,6-glucan obtained by culturing a bacterium belonging to the genus *Aureobacidium* sp. together with lactic acid bacterium cells, is obtained. This composition containing β -glucan is employed as the active ingredient of a constipation-relieving drug, an immunopotentiator and a skin moistening agent. As the above-described bacterium belonging to the genus *Aureobacidium* sp., *Aureobasidium pullulans* M-1 (FERM BP-08615) is preferable. As the above-described lactic acid bacterium, *Enterococcus faecalis* is preferable. It is still preferable that this lactic acid bacterium has been killed by heating. The content of the culture medium in solid matters preferably ranges from 1 to 80% by mass in terms of β -1,3-1,6-glucan, while the content of the lactic acid bacterium cells preferably ranges from 4 to 95% by mass.

(57) 要約: 本発明は、アウレオバシジウム属 (*Aureobacidium* sp.) に属する菌の培養物に含まれる β -1, 3-1, 6-グルカンの生理活性効果を更に高めた β -グルカン含有組成物及び該組成物を利用した便秘改善剤、免疫賦活剤並びに皮膚用保湿剤を提供する。アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物と、乳酸菌菌体とを含有する β -グルカン含有組成物を得る。この β -グルカン含有組成物を、便秘改善剤、免疫賦活剤あるいは皮膚用保湿剤の有効成分として含有させる。前記アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌は、アウレオバシジウム プルランス M-1 (*Aureobasidium pullulans* M-1) (FERM BP-08615) であることが好ましい。また、前記乳酸菌はエンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) であることが好ましく、前記乳酸菌は加熱殺菌されたものであることが好ましい。更に、固形分中に、前記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で 1 ~ 80 質量%含有し、かつ前記乳酸菌菌体を 4 ~ 95 質量%含有することが好ましい。

WO 2004/078188 A1

明 細 書

β -グルカン含有組成物及び該組成物を利用した便秘改善剤、免疫賦活剤並びに皮膚用保湿剤

技術分野

本発明は、 β -1, 3-1, 6-グルカンを含むアウレオバシジウム属に属する菌の培養物と乳酸菌の菌体とを有効成分として含有する β -グルカン含有組成物に関し、更には該組成物を利用した便秘改善剤、免疫賦活剤並びに皮膚用保湿剤に関する。

背景技術

アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌 (通称、黒酵母) が産生する β -1, 3-1, 6-グルカンは、免疫増強作用、抗腫瘍活性、ガン細胞増殖抑制作用、抗アレルギー作用、抗炎症作用、コレステロール低下作用、抗血栓作用、食物繊維作用、血圧降下作用、血糖降下作用、肝機能亢進等の様々な生理活性を有していることが知られている。そのため、 β -1, 3-1, 6-グルカンを機能性素材や医薬品等として利用する試みが数多くなされている。

例えば、特開昭57-149301号公報には、不完全菌黒色菌科アウレオバシジウム (Aureobacidium) 属の菌 (微工研寄託No.4257号) が産生する多糖を主成分とする整腸剤その他の医薬が開示されている。

特公平5-4063号公報には、フラクトオリゴ糖と β -1, 3-1, 6-グルカンを主成分とする飲食品の製造方法が開示されており、この飲食品は、健康維持飲料 (腸内ビフィズス菌の増殖、便秘防止、免疫増強)、整腸剤等に利用できる旨記載されている。

特開2002-335926号公報には、 β -1, 3-1, 6-グルカン及びリンゴ抽出物を含有する組成物が開示されており、この組成物が飲料や皮膚塗布剤として有用である旨、該飲料には、各種アレルギー症状の低減効果、免疫異常疾患の改善効果、がん抑制効果、血管障害疾患の改善効果、ウイルス性疾患の改善効果、泌尿器系疾患の改善効果、便秘、下痢等の消化器系疾患の改善効果が期待できる旨記載されている。

特開平 6-340701 号公報には、オウレオバシディウム プルランス (*Aureobasidium pullulans*) IF04466 菌株の培養上清から得られる、 β -1, 3 結合グルコース残基を主鎖として、これに β -1, 6 結合グルコース残基の分岐鎖を多数側鎖として有する数平均分子量 1 万~500 万の高分岐度 β -グルカンが、経口的に高い抗腫瘍活性及び免疫賦活活性を有し、医薬、食品添加物、飼料添加物等として有用である旨が記載されている。

特開 2002-204687 号公報には、 β -1, 3-1, 6 グルカンの主成分とするアウレオバシジウム培養液が、各種疾病に対する医薬品として応用できる旨が記載されている。

特開昭 62-205008 号公報には、結合様式 β -1, 3-1, 6-グルカンを含む化粧料等の添加剤が開示されている。そして、 β -1, 3-1, 6-グルカンを含む化粧料を水溶液にして、そのまま皮膚や毛髪に塗布すると、従来の化粧料、整髪料、軟膏添加材に比べて皮膚や毛髪面の皮膜形成性、保湿性が優れていることが記載されている。

特開平 10-310515 号公報には、微生物により生産される少なくとも 1 種の細胞外ホモ多糖、又は該細胞外ホモ多糖と少なくとも 1 種のアミノ酸とを含むことを特徴とする入浴剤が開示されている。そして、前記細胞外ホモ多糖の構成糖が β -D-グルコースであること、前記 β -D-グルコースが、オウレオバシジウム属に属する微生物により生産される β -1, 3-1, 6-グルカンであることが記載されている。

一方、乳酸菌を利用した免疫賦活剤として、例えば、特開 2001-48796 号公報には、*Enterococcus faecalis* AD101 菌株の死菌体を主成分とする免疫調整剤が開示されている。

また、特開 2003-113114 号公報には、エンテロコッカス属に属する乳酸菌および麹菌を液体培養によって培養された菌体を有効成分とすることを特徴とする免疫賦活素材が開示されている。

更に、 β -グルカンと乳酸菌を併用したものとして、例えば、特開 2003-40785 号公報には、 β -グルカンを含む素材と、乳酸産生菌の加熱処理菌体とを有効成分として含有することを特徴とする感染抑制組成物が開示されている。

また、特開 2001-323001 号公報には、体内における TNF をはじめとするサイトカインの産生を促進し、その作用を増強させ、抗体産生能或いは免疫作用全体を

増強することによって各種感染症や腫瘍発生の予防に役立つ、低分子量の水溶性 β -グルカンが開示されており、この β -グルカンと乳酸菌を併用することが記載されている。

しかしながら、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌 (通称、黒酵母) が産生する β -1, 3-1, 6-グルカン単独では、上記各種の生理活性効果が未だ十分とは言えず、更に効果の高い素材が求められていた。

発明の開示

本発明の目的は、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌の培養物に含まれる β -1, 3-1, 6-グルカンの生理活性効果を更に高めた β -グルカン含有組成物及び該組成物を利用した便秘改善剤、免疫賦活剤並びに皮膚用保湿剤を提供することにある。

上記目的を達成するため、本発明の一つは、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物と、乳酸菌菌体とを有効成分として含有することを特徴とする β -グルカン含有組成物である。

本発明の β -グルカン含有組成物は、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物を有効成分として含有するので、 β -1, 3-1, 6-グルカンのみならず、培養物に含まれる様々な有用成分を損なうことなく利用できる。また、乳酸菌菌体を有効成分として含有するので、前記培養物に含まれる有用成分と乳酸菌菌体との相乗効果により、様々な生理活性効果が期待できる。また、上記各成分は飲食品等に利用されている天然物由来の成分であるため安全性も高い。

上記発明においては、前記アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌は、アウレオバシジウム プルランス M-1 (Aureobasidium pullulans M-1) (FERM BP-08615) であることが好ましい。この態様によれば、より生理活性の高い β -1, 3-1, 6-グルカンを簡単に調製することができる。

また、固形分中に、前記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で1~80質量%含有し、かつ前記乳酸菌菌体を4~95質量%含有することが好ましい。

更に、前記乳酸菌はエンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) であることが好ましい。

これらの態様によれば、 β -1, 3-1, 6-グルカンと乳酸菌菌体による相乗的な生理活性効果をより期待することができる。

更にまた、前記乳酸菌は加熱殺菌されたものであることが好ましい。この態様によれば、加熱処理が必要な商品にも幅広く添加することができる。また、保存安定性が高く、飲食品や医薬品等の原料として用いる場合の安全性も非常に高い。

本発明のもう一つは、前記 β -グルカン含有組成物を有効成分として含有する便秘改善剤である。

本発明の便秘改善剤は、上記 β -グルカン含有組成物を有効成分として含むので、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物に含まれる様々な有用成分と乳酸菌菌体との相乗効果により、優れた便秘改善効果が期待できる。

本発明のもう一つは、前記 β -グルカン含有組成物を有効成分として含有する免疫賦活剤である。

本発明の免疫賦活剤は、上記 β -グルカン含有組成物を有効成分として含むので、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物に含まれる様々な有用成分と乳酸菌菌体との相乗効果により、優れた免疫賦活効果が期待できる。

本発明のもう一つは、前記 β -グルカン含有組成物を有効成分として含有する皮膚用保湿剤である。

本発明の皮膚用保湿剤は、上記 β -グルカン含有組成物を有効成分として含むので、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物に含まれる様々な有用成分と乳酸菌菌体との相乗効果により、保湿効果の持続性や使用感に優れた皮膚用保湿剤を提供できる。

図面の簡単な説明

図1は、リステリア菌摂取後の生存率と経過日数との関係を示す図である。

図2は、リステリア菌摂取後の生存率に及ぼす被験物質の影響を示す図である。

図3は、リステリア菌摂取後の平均生存日数と被験物質との関係を示す図である。

図4は、リステリア菌摂取後の脾臓内菌数の経時的変化に及ぼす被験物質の影響を示す図である。

図5は、リステリア菌摂取後、フローサイトメータを用いて細胞表面分子の解析を行った結果を示す図（写真）である。

図6は、被験者1（20代女性）における表皮角質層水分量（皮表コンダクタンス μ S）の経時的変化を測定した結果を示す図である。

図7は、被験者2（20代女性）における表皮角質層水分量（皮表コンダクタンス μ S）の経時的変化を測定した結果を示す図である。

図8は、被験者3（30代女性）における表皮角質層水分量（皮表コンダクタンス μ S）の経時的変化を測定した結果を示す図である。

図9は、被験者4（40代女性）における表皮角質層水分量（皮表コンダクタンス μ S）の経時的変化を測定した結果を示す図である。

図10は、被験者5（50代女性）における表皮角質層水分量（皮表コンダクタンス μ S）の経時的変化を測定した結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明において、アウレオバシジウム属（*Aureobasidium* sp.）に属する菌を培養して得られる培養物（以下、単に培養物という。）としては、アウレオバシジウム属（*Aureobasidium* sp.）に属し、 β -1, 3-1, 6-グルカン生産能を有する菌を培養した培養液そのもの、該培養液の濃縮液、あるいは該培養液から水分を除いた固形物等を用いることができるが、好ましくは培養液そのもの又は該培養液の濃縮液が用いられ、その場合、固形分濃度が0.5～5質量%であることが好ましく、1～3質量%であることがより好ましい。

上記アウレオバシジウム属（*Aureobasidium* sp.）に属する菌としては、例えば、特開昭57-149301号公報、特公平5-4063号公報、特開2002-335926号公報等に記載された菌株を用いることができるが、本発明においては、アウレオバシジウム プルランス M-1（*Aureobasidium pullulans* M-1、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター寄託番号FERM BP-08615）が好適に用いられる。なお、

本発明において、 β -1, 3-1, 6-グルカンとは、グルコースが β -1, 3結合した主鎖から β -1, 6結合でグルコースが分岐した構造を有するものを意味する。

上記アウレオバシジウム属 (*Aureobasidium* sp.) に属する菌の培養は、公知の方法 (特開昭57-149301号公報等参照) に準じて行うことができる。すなわち、炭素源 (ショ糖) 0.5~5.0質量%、N源0.1質量%、その他微量物質 (例えば、ビタミン類、無機質) を加えた培地 (pH5.2~6.0) に菌を接種し、温度20~30℃で2~7日間通気培養、好ましくは通気攪拌培養すればよい。 β -1, 3-1, 6-グルカンが生成されるにしたがって培養液の粘度が上昇し、粘性の高いジェル状になる。このようにして得られる培養液には、通常、0.6~1.8質量%の固形分が含まれており、該固形分中には β -1, 3-1, 6-グルカンが5~80質量%含まれている。また、 β -1, 3-1, 6-グルカン以外にも、例えば、該グルカンの吸収を助ける成分であるリン、カリウム、マグネシウム、ビタミンC等の他の有用成分も含まれているので、 β -1, 3-1, 6-グルカンの有する生理活性効果を効率よく発揮できる。

本発明においては、固形分中に β -1, 3-1, 6-グルカンを1質量%以上、好ましくは5質量%以上、より好ましくは10質量%以上、特に好ましくは20質量%以上含む培養物が用いられる。培養物中の β -1, 3-1, 6-グルカン濃度が低すぎると、該グルカンの生理活性効果が十分に期待できない。

なお、 β -1, 3-1, 6-グルカンの定量は、例えば次のような方法で行うことができる。すなわち、培養液にアミラーゼ、アミログルコシダーゼ、プロテアーゼ等を用いて酵素処理を施し、蛋白質や、プルラン等の α -グルカンを除き、エタノール沈殿を行う。更に、ガラスフィルターでろ過し、高分子試料を得る。このとき、単糖を含む低分子物質を除くため、80%エタノールで十分に洗浄する。洗浄した高分子試料はアセトンで更に洗浄し、硫酸を加え、加水分解を行う。加水分解後、中和し、そのろ液を採取して、グルコースオキシダーゼ法によりブドウ糖を定量し、下記数式1に基づいて計算した値をグルカン量とする。

$$\text{数式1: } \beta\text{-グルカン (g/100g)} = \text{ブドウ糖 (g/100g)} \times 0.9$$

また、 β -1, 3-1, 6-グルカンの定量は、特公平3-48201号公報に記載された方法に準じて行うこともできる。すなわち、培養終了後、培養液を殺菌して、遠

心分離して菌体を除去し、得られた溶液にクロロホルム／ブタノール混合液を10% (v/v) 加えて振とう (Sevage法) した後、遠心処理してクロロホルムと不溶物を除去する。この操作を2回繰り返した後、エタノール沈殿により、沈殿物を回収して蒸留水に溶解し、酵素処理により、プルランを分解し、蒸留水中で透析を行い、透析液をエタノール沈殿して、沈殿物 (β -1, 3-1, 6-グルカン) を回収して収量を求めればよい。

本発明においては、上記のようにして得られる培養液をそのまま加熱又は加圧加熱殺菌して用いてもよく、遠心分離等により菌体を分離除去した後殺菌して用いてもよい。また、必要に応じて濃縮したもの、更には乾燥したものをを用いることもできる。なお、アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌の培養物は、増粘安定剤等の食品添加物として使用されており、安全性は高い。

一方、本発明で用いられる乳酸菌としては、食品に使用可能な乳酸菌であれば特に制限なく用いることができ、具体的には、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis)、エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)、ラクトバチルス・アシドフィルス (Lactobacillus acidophilus)、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei)、ストレプトコッカス・クレモリス (Streptococcus cremoris)、ストレプトコッカス・ラクティス (Streptococcus lactis)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus)、ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (Bifidobacterium breve)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (Bifidobacterium bifidum) 等が例示できる。上記乳酸菌は単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

なお、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis)、エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium) は乳酸菌製剤等に用いられている乳酸菌であり、ラクトバチルス・カゼイ (Lactobacillus casei)、ラクトバチルス・アシドフィルス (Lactobacillus acidophilus) は、チーズ、発酵乳、ヨーグルト、乳酸菌飲料等に用いられている乳酸菌であり、ストレプトコッカス・クレモリス (Streptococcus cremoris)、ストレプトコッカス・ラクティス (Streptococcus lactis)、ストレプトコッカス・サーモフィラス (Streptococcus thermophilus) は、チーズ、ヨーグルト等

に用いられている乳酸菌であり、ビフィドバクテリウム・ロンガム (Bifidobacterium longum)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (Bifidobacterium breve)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (Bifidobacterium bifidum) は発酵乳等に用いられている乳酸菌である。したがって、これらの乳酸菌はいずれも当業者が容易に入手できるものである。

本発明においては、上記の乳酸菌の中でも、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis、例えば、ATCC 19433、ATCC 14508、ATCC 123655、IFO 16803等) が特に好ましく用いられる。上記培養物とエンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) とを併用することにより、これらの成分による相乗的な生理活性効果（例えば、便秘改善効果、免疫賦活効果、保湿効果等）がより期待できる。

本発明において、上記乳酸菌は加熱殺菌されたものであることが好ましい。これにより、加熱処理が必要な商品にも幅広く添加することができる。また、保存安定性が高く、飲食品や医薬品等の原料として用いる場合の安全性も非常に高くなり、特に、皮膚用保湿剤に用いる場合に好適である。

上記乳酸菌の培養は常法にしたがって行えばよく、例えば、上記乳酸菌を常法にしたがって培養して得られた培養物から、濾過、遠心分離等の方法により菌体を回収し、水洗後、水等に懸濁して80～115℃、30分～3秒間加熱処理すればよい。加熱殺菌した乳酸菌は、必要に応じて濃縮、乾燥してから用いてもよい。

本発明のβ-グルカン含有組成物は、例えば、上記アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌の培養液を殺菌したものに、上記乳酸菌の加熱殺菌菌体を混合して分散させることにより得ることができる。また、必要に応じて、錠剤、カプセル剤、粉末、顆粒、液状、ペースト状、ゼリー状等の各種形態とすることもできる。

本発明のβ-グルカン含有組成物は、固形分中に、上記培養物をβ-1，3-1，6-グルカン換算で1～80質量%含有し、かつ上記乳酸菌菌体を4～95質量%含有することが好ましい。また、上記基本的成分以外に、香料、甘味料、ビタミン類、ミネラル類、オリゴ糖、増粘多糖類、デキストリン、植物エキス、その他の植物成分等を適宜含むことができる。

本発明のβ-グルカン含有組成物は、そのまま便秘改善剤、免疫賦活剤、皮膚用保湿

剤等として用いることができる。

例えば、本発明の β -グルカン含有組成物を便秘改善剤として用いる場合は、固形分中に、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で1~40質量%含有し、かつ上記乳酸菌菌体を4~95質量%含有することが好ましく、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で2~40質量%含有し、かつ上記乳酸菌菌体を10~95質量%含有することがより好ましく、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で3~40質量%含有し、かつ上記乳酸菌菌体を30~95質量%含有することが特に好ましい。

本発明の便秘改善剤の有効摂取量は、成人1日当たり、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で0.01~10g、かつ上記乳酸菌菌体を0.01~10gであり、好ましくは、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で0.5~5g、かつ上記乳酸菌菌体を0.05~1gである。

本発明の便秘改善剤は、例えば、清涼飲料、ゼリー飲料、果汁飲料、野菜ジュース、スープ、味噌汁、冷凍食品、その他の加工食品等の各種飲食品に配合することもできる。上記各飲食品における本便秘改善剤の添加量は、上記の成人1日当たりの有効摂取量に基づいて設定すればよいが、通常、1~50質量%が好ましく、10~20質量%がより好ましい。なお、添加方法は、特に制限はなく、各飲食品に用いられる他の原料と一緒に最初から添加することもできる。

また、本発明の β -グルカン含有組成物を免疫賦活剤として用いる場合は、固形分中に、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で5~80質量%含有し、かつ上記乳酸菌菌体を10~80質量%含有することが好ましく、更には上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で25~70質量%含有し、かつ上記乳酸菌菌体を20~70質量%含有することがより好ましく、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で30~60質量%含有し、かつ上記乳酸菌菌体を30~60質量%含有することが最も好ましい。

本発明の免疫賦活剤の有効摂取量は、成人1日当たり、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で0.02~0.50g、かつ上記乳酸菌菌体を0.10~0.90gであり、好ましくは、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で0.06~0.40g、かつ上記乳酸菌菌体を0.15~0.45gである。

また、本発明の免疫賦活剤は、例えば、清涼飲料、ゼリー飲料、果汁飲料、野菜ジュース、スープ、味噌汁、冷凍食品、その他の加工食品等の各種飲食品に配合することもできる。上記各飲食品における本免疫賦活剤の添加量は、上記の成人1日当たりの有効摂取量に基づいて設定すればよいが、通常、 β -1, 3-1, 6グルカン換算で0.02~0.50質量%が好ましく、0.06~0.40質量%がより好ましい。また、乳酸菌菌体に関しては、0.10~0.90質量%が好ましく、0.15~0.45質量%がより好ましい。なお、添加方法は特に制限はなく、各飲食品に用いられる他の原料と一緒に最初から添加することもできる。

また、本発明の β -グルカン含有組成物を皮膚用保湿剤として用いる場合は、固形分中に、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で1~40質量%含有し、かつ上記乳酸菌の加熱殺菌菌体を4~95質量%含有することが好ましく、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で2~40質量%含有し、かつ上記乳酸菌の加熱殺菌菌体を10~95質量%含有することがより好ましく、上記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で3~40質量%含有し、かつ上記乳酸菌の加熱殺菌菌体を30~95質量%含有することが特に好ましい。 β -グルカンを含有する素材の配合量が少なすぎると十分な保湿効果が得られず、多すぎると製品の流動性（のびやすさ）が低下し、使用感が低下する。また、乳酸菌の加熱殺菌菌体の配合量が少なすぎると十分な保湿効果の持続性が得られず、多すぎると製品中での分散性が低下し、均一な製品を得ることができない。

なお、上記培養物と上記乳酸菌の加熱殺菌菌体とを併用することにより、保湿効果の持続性が向上する理由は明確には分らないが、例えば、乳酸菌の加熱殺菌菌体が担体となって、 β -グルカンや水分を保持していることが考えられる。特に、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) は、ラクトバチルスやビフィズス菌等の他の乳酸菌に比べて、菌体の大きさが小さいため、添加質量当たりの菌体数が多くなり、保湿効果を高めることができるものと考えられる。

本発明の皮膚用保湿剤は、そのまま化粧水や化粧液として用いてもよく、各種皮膚用化粧品（例えば、乳液、クリーム、パック等）に配合して用いてもよい。該皮膚用保湿剤の皮膚用化粧品への配合量は、0.5~50質量%が好ましく、5~20質量%がより好ましい。

実施例

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、以下の説明において、特に断りのない限り、「%」は「質量%」を表す。

実施例 1

(1) アウレオバシジウムの培養

アウレオバシジウム プルランス M-1 (*Aureobasidium pullulans* M-1) (FERM BP-08615) の前培養液を、ショ糖 1%、アスコルビン酸 0.2%、米糠 0.2% を含む液体培地 (pH 5.3) に適量接種して、25℃、2日間、通気攪拌培養を行った。培養終了後、この培養液を 121℃、15分間殺菌した。この培養液は固形分 1% であり、該固形分中に 35% の β -1, 3-1, 6-グルカンを含んでいた。

(2) エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) の培養

エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*, IF0 16803) を、ロゴサ培地で 37℃、24時間培養した前培養液を、酵母エキス 4%、ポリペプトン 3%、乳糖 10% を含む液体培地に適量接種し、pH スタットを用いて pH 6.8~7.0 に苛性ソーダ水溶液で調整しながら 37℃、22~24時間中和培養を行った。

培養終了後、連続遠心機で菌体を分離、回収した後、水を加えて元の液量まで希釈して再度連続遠心機で菌体を分離、回収した。この操作を合計 4 回繰り返して菌体を洗浄した。次いで、洗浄した菌体を適量の水に懸濁し、100℃、30分間殺菌した後、スプレードライヤーを用いて菌体を乾燥して加熱殺菌菌体粉末 (5×10^{12} cfu/g) を調製した。

(3) 便秘改善効果の確認

上記 (1) で得られたアウレオバシジウム培養物と、上記 (2) で得られた乳酸菌の加熱殺菌菌体を用いて、以下の方法により便秘改善効果の確認試験を行った。

試験期間は 4 週間とし、便秘体質のボランティア 10 名に、最初の 1 週間 (第 1 週目) は何も投与せず、次の 1 週間 (第 2 週目) は乳酸菌菌体 (200mg/日) を投与し、次の 1 週間 (第 3 週目) はアウレオバシジウム培養物 (15ml/日) を投与し、最後の 1 週間 (第 4 週目) はアウレオバシジウム培養物 (15ml/日) 及び乳酸菌菌体 (200mg/日) を投与した。そして、各試験サンプルの投与期間 1 週間における

排便回数をチェックしてもらった。その結果を表1に示す。

【表1】

	排便回数			
	第1週目	第2週目	第3週目	第4週目
被験者	投与前	乳酸菌菌体のみ	アウレオバシジウム培養物のみ	アウレオバシジウム培養物+乳酸菌菌体
1	3	3	3	5
2	2	4	2	5
3	4	4	3	6
4	3	4	3	5
5	2	2	2	3
6	2	3	3	4
7	4	5	3	7
8	2	3	3	5
9	3	3	3	6
10	3	4	3	5
平均	2.8	3.5	2.8	5.1

表1から、乳酸菌菌体のみを投与した場合には、若干の便秘改善効果が認められるが、アウレオバシジウム培養物のみを投与した場合は、便秘改善効果がほとんど認められないことが分かる。一方、アウレオバシジウム培養物と乳酸菌菌体を併用した場合、排便回数の増加が認められ、明らかに便秘が改善されていることが分かる。

実施例2

実施例1(1)で得られたアウレオバシジウム培養物1Lに、実施例1(2)で得られた乳酸菌の加熱殺菌菌体10gを加えて、均一に混合して β -グルカン含有組成物を得た。この β -グルカン含有組成物を用いて、以下の方法により初期感染防御効果について調べた。

(1) 生存率の測定

1週間予備飼育を行ったBALB/cマウス(7週齢、雌)28匹(日本エスエルシー(株)より購入)を4群(各群7匹)に分け、各群に下記の被験物質をマウス1匹当たり200 μ lずつ、1日1回試験期間中連続経口投与した。

試験群：上記 β -グルカン含有組成物

比較群 1：アウレオバシジウム培養液（実施例 1（1）で得られたもの）

比較群 2：乳酸菌の加熱殺菌菌体（実施例 1（2）で得られたもの）を PBS に懸濁したもの（1 g 菌体 / 100 ml）

対照群：PBS

上記各被験物質を 1 週間連続経口投与した各群のマウスの尾静脈内に、細胞内寄生性細菌であるリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*, EGD 株) を 5.4×10^4 cfu / 200 μ l / マウス ($2 \times LD_{50}$) となるように接種し、その後 2 週間経過観察を行い、各群のマウスの生存率及び平均生存期間を求めた。

その結果を表 2 及び図 1～3 に示す。なお、試験期間中、水及び飼料（商品名「粉末飼料 CRF-1」、オリエンタル酵母株式会社製）は自由摂取とした。

【表 2】

群	生存率	平均生存日数
試験群	85.7% (6/7)	12.7 日
比較群 1	71.4% (5/7)	11.5 日
比較群 2	28.6% (2/7)	6.4 日
対照群	0% (0/7)	3.0 日

表 2 及び図 1～3 から分かるように、試験群においては、1 例が死亡（菌接種後 6 日目）したのみであり、試験終了時の生存率は 85.7% であったが、対照群においては、全例が死亡（細菌接種 4 日目）し、試験終了時の生存率は 0% であった。また、比較群 1 においては、2 例が死亡（菌接種 6 日目に 1 例、7 日目に 1 例）し、試験終了時の生存率は 71.4% であった。また、比較群 2 においては、5 例が死亡（菌接種 4 日目に 3 例、5 日目に 2 例）し、試験終了時の生存率は 28.6% であった。試験群と他の群間の有意差を Mann-Whitney の U 検定を用いて検定したところ、試験群は対照群及び比較群 2 に対して危険率 1% 未満で有意差が認められた。

また、平均生存期間に関しては、試験群においては 12.7 日であったのに対し、対照群が 3.0 日、比較群 1 が 11.5 日、比較群 2 が 6.4 日であった。試験群と他の群間の有意差を Mann-Whitney の U 検定を用いて検定したところ、試験群は対照群及び比較群 2 に対して危険率 1% 未満で有意差が認められた。

この結果から、本 β -グルカン含有組成物を経口摂取することにより、細菌感染に

における宿主の感染抵抗性を亢進させることが示唆された。

(2) 臓器内菌数測定

上記(1)において、リステリア菌に対する感染抵抗性に本β-グルカン含有組成物が作用をしていることが示唆されたため、菌排除の指標となる臓器内菌数の経時的変化について解析を行った。

1週間予備飼育を行ったBALB/cマウス(7週齢、雌)を1群当り30匹使用し、上記と同様にして各被験物質を投与した。そして、上記各被験物質を1週間連続経口投与した各群のマウスの尾静脈内に、細胞内寄生性細菌であるリステリア菌(*Listeria monocytogenes*, EGD株)を $2.7 \times 10^3 \text{ cfu} / 200 \mu\text{l} / \text{マウス}$ ($1 / 10 \times \text{LD}_{50}$)となるように接種し、細菌接種後1日目、3日目、5日目、7日目及び10日目に逐日的に5匹ずつ各群のマウスを屠殺し、脾臓を回収した。

回収した脾臓をブレンダーにてすり潰してPBS 5ml中に再懸濁し、これを原液とした。この原液を10倍階段希釈法にて希釈し、原液及び各希釈系列液より100μl取り、TSA培地上に塗抹し37℃孵卵器にて16時間培養した。TSA培地上に発育した細菌集落数を測定し、臓器内菌数を算出した。臓器内菌数は、各群毎に平均値及び標準誤差を算出した。その結果を表3及び図4に示す。

【表3】

群	リステリア菌接種後の経過日数				
	1日	3日	5日	7日	10日
試験群	$6.88 \pm 8.18 \times 10^4$	$9.79 \pm 7.76 \times 10^4$	$2.86 \pm 1.45 \times 10^4$	$7.24 \pm 8.78 \times 10^2$	$2.76 \pm 2.54 \times 10^1$
比較群1	$5.66 \pm 1.77 \times 10^4$	$1.20 \pm 1.13 \times 10^6$	$3.83 \pm 2.76 \times 10^4$	$1.36 \pm 1.87 \times 10^3$	検出限界未満
比較群2	$7.06 \pm 0.30 \times 10^4$	$7.12 \pm 4.06 \times 10^5$	$2.00 \pm 1.56 \times 10^4$	$9.75 \pm 14.9 \times 10^2$	検出限界未満
対照群	$4.37 \pm 7.47 \times 10^3$	$1.00 \pm 1.62 \times 10^7$	$1.14 \pm 0.85 \times 10^5$	$1.17 \pm 2.36 \times 10^4$	$3.75 \pm 7.50 \times 10^4$

表3から分かるように、対照群では、細菌接種3日目に脾臓内の細菌数がピークとなり、その後は徐々に減少し菌接種10日目に検出限界付近($3.75 \pm 7.5 \text{ CFU} / \text{脾臓}$)となった。一方、試験群においては、菌接種後1日目より菌の増加を認めたが、菌接種3日目は1日目とほぼ同等の菌数を示し、その後減少し菌接種10日目では

27 ± 25 CFU/脾臓となった。比較群1及び比較群2では、菌接種後1日目より菌の増加を認め、菌接種3日目に脾臓内細菌数のピークを認め、その後徐々に菌は減少し、菌接種10日目には検出限界未満 (< 3.33 CFU/脾臓) となった。

この結果から、本β-グルカン含有組成物は感染早期での免疫機構に作用しており、感染抵抗性の亢進は、成熟T細胞による攻撃性の強い免疫機構よりも未熟型T細胞もしくは貪食細胞による非特異的免疫機構により行われている可能性が推測された。

(3) 細胞表面分子の解析

上記(1)、(2)において、生存率、生存期間及び臓器内菌数に差異が認められたため、リステリア菌に対する感染抵抗性に関与する生体側の細胞に関してフローサイトメータによる解析を行った。

上記(2)の臓器内菌数測定と同時に腸間膜リンパ節(MLN)を回収した。回収したMLNをスライドガラスにてすり潰し、ステンレスメッシュにて余分な組織片を除去した後、リンパ球を 1×10^6 /mlとなるようにFACS用Hank's液に再懸濁した。下記(a)～(d)に示す4種類の染色パターンにてリンパ球を染色し、フローサイトメータ(Epics-XL; Beckman Coulter)を用いて細胞(T細胞中心)表面分子の解析を行った。その結果を表4及び図5に示す。

(a) Cy-chrome(Cy)標識抗CD3mAb(T細胞固有認識マーカー)/FITC標識抗TCR $\alpha\beta$ mAb(T細胞型別認識マーカー)/PE標識抗CD4mAb/biotin標識抗TCR $\gamma\delta$ (T細胞型別認識マーカー)mAb

(b) Cy標識抗CD3mAb/FITC標識抗TCR $\alpha\beta$ mAb/PE標識抗CD4mAb/biotin標識抗CD69mAb(早期活性化マーカー)

(c) Cy標識抗CD3mAb/FITC標識抗TCR $\alpha\beta$ mAb/PE標識抗CD4mAb/biotin標識抗CD25mAb(IL-2R α ; 活性化マーカー)

(d) Cy標識抗CD3mAb/FITC標識抗TCR $\alpha\beta$ mAb/PE標識抗CD122mAb(IL-2R β ; 活性化マーカー)/biotin標識抗CD4mAb

【表 4】

群	CD 2 5 / CD 1 2 2 / CD 6 9 発現率 (%)					
	リステリア菌接種後の経過日数					
	0 日	1 日	3 日	5 日	7 日	1 0 日
試験群	20/20/20	21/20/20	24/23/35	20/22/20	24/20/20	19/20/20
比較群 1	20/20/20	20/22/20	21/22/33	21/20/20	20/22/20	20/20/21
比較群 2	20/20/20	20/20/20	24/20/38	20/23/20	23/19/20	20/18/20
対照群	20/20/21	20/20/19	22/23/28	21/20/20	20/20/21	20/22/20

表 4 及び図 5 に示されるように、試験群、比較群 1、2 は、対照群に比べて CD 4 陽性 $\alpha \beta$ 型 T 細胞の増加が認められた。特に、試験群においては、比較群 1、2 よりも増加の割合が多かった。なお、菌感染 3 日後においては、いずれの群もほぼ同様の割合を示した。一方、CD 4 陽性細胞中の活性化マーカーに関しては、CD 2 5 分子 (IL-2 R α)、CD 1 2 2 分子 (IL-2 R β) 及び CD 6 9 分子 (早期活性化マーカー) いずれも各群を問わずほぼ同等の発現程度であった。

この結果から、試験群では感染前と感染後も CD 4 陽性 $\alpha \beta$ 型 T 細胞の著しい変化は認められなかったので、本 β -グルカン含有組成物による感染抵抗性の亢進は、分化の低い細胞集団の機能亢進によるものと推測された。

なお、血液中のサイトカインに関して、市販の IFN- γ 測定キット (ゲンザイム社製) の方法で測定したところ、表 5 に示すように、試験群では感染 3 日目に IFN- γ 量が高値を示した。CD 4 陽性 $\alpha \beta$ 型 T 細胞の変化は認められなかったことより、IFN- γ を産生している細胞はマクロファージの可能性が考えられた。

【表 5】

群	I F N - γ 産生量 (u n i t s / m l)					
	リステリア菌接種後の経過日数					
	0 日	1 日	3 日	5 日	7 日	1 0 日
試験群	2 0	1 0 0	4 5 0	3 0 0	1 4 0	8 0
比較群 1	2 0	1 2 0	2 4 0	3 0 0	2 6 0	1 0 0
比較群 2	2 0	1 4 0	3 6 0	3 2 0	1 4 0	1 0 0
対照群	2 0	6 0	8 0	1 4 0	2 4 0	1 6 0

実施例 3

実施例 1 (1) で得られたアウレオバシジウム培養培養液と、実施例 1 (2) で得ら

れた乳酸菌の加熱殺菌菌体を用いて、下記に示す被験サンプルを調製し、5名の女性ボランティア（20代2名、30代、40代、50代各1名）による保湿効果の確認試験を行った。

・被験サンプル

- 1：アウレオバシジウム培養液のみ
- 2：乳酸菌加熱殺菌菌体1%水懸濁液
- 3：乳酸菌加熱殺菌菌体1%含有アウレオバシジウム培養液
- 4：水（対照）

各被験者は、測定部位（前腕内側屈曲部より5cm下の幅3cm×長さ10cmの範囲）を石鹸で洗浄した後、温度18～20℃、湿度50～55%に調整された恒温恒湿条件下の室内で20分間安静にしてもらった。そして、上記測定部位を4つに区分けし、各区に上記被験サンプル1～4をそれぞれ10 μ l塗布した後、表皮角質層水分量（皮表コンダクタンス μ S）を、高周波インピーダンス法を応用した表皮角質層水分量測定装置「SKINCON-200」（商品名、アイ・ビー・エス株式会社製）を用いて各区を経時的に測定した。なお、表皮角質層水分量の測定は、被験サンプル塗布5分前（-5分）、塗布直後（0分）、塗布後10、20、30、60分に行った。その結果を図6～10に示す。なお、図6～10において、1～4はそれぞれ被験サンプル1～4に対応する。

図6～10から、被験サンプル3を塗布した場合、被験サンプル1、2に比べて、塗布後時間が経過しても、表皮角質層水分量が高く維持されており、保湿効果が持続していることが分かる。また、被験者に使用感をアンケートしたところ、べたつきや油っぽさもなく、使用感もよいとのことであった。

産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明の β -グルカン含有組成物は、アウレオバシジウム属（*Aureobasidium* sp.）に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物と乳酸菌菌体とを含有するので、これらの成分の相乗効果によって優れた生理活性効果が期待でき、便秘改善剤、免疫賦活剤、皮膚用保湿剤等として利用することができる。

請 求 の 範 囲

1. アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌を培養して得られる β -1, 3-1, 6-グルカンを含む培養物と、乳酸菌菌体とを有効成分として含有することを特徴とする β -グルカン含有組成物。
2. 前記アウレオバシジウム属 (Aureobasidium sp.) に属する菌は、アウレオバシジウム プルランス M-1 (Aureobasidium pullulans M-1) (FERM BP-08615) である請求項1記載の β -グルカン含有組成物。
3. 固形分中に、前記培養物を β -1, 3-1, 6-グルカン換算で1~80質量%含有し、かつ前記乳酸菌菌体を4~95質量%含有する請求項1又は2記載の β -グルカン含有組成物。
4. 前記乳酸菌はエンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis) である請求項1~3のいずれか一つに記載の β -グルカン含有組成物。
5. 前記乳酸菌は加熱殺菌されたものである請求項1~4のいずれか一つに記載の β -グルカン含有組成物。
6. 請求項1~5のいずれか一つに記載の β -グルカン含有組成物を有効成分として含有する便秘改善剤。
7. 請求項1~5のいずれか一つに記載の β -グルカン含有組成物を有効成分として含有する免疫賦活剤。
8. 請求項1~5のいずれか一つに記載の β -グルカン含有組成物を有効成分として含有する皮膚用保湿剤。

図 1

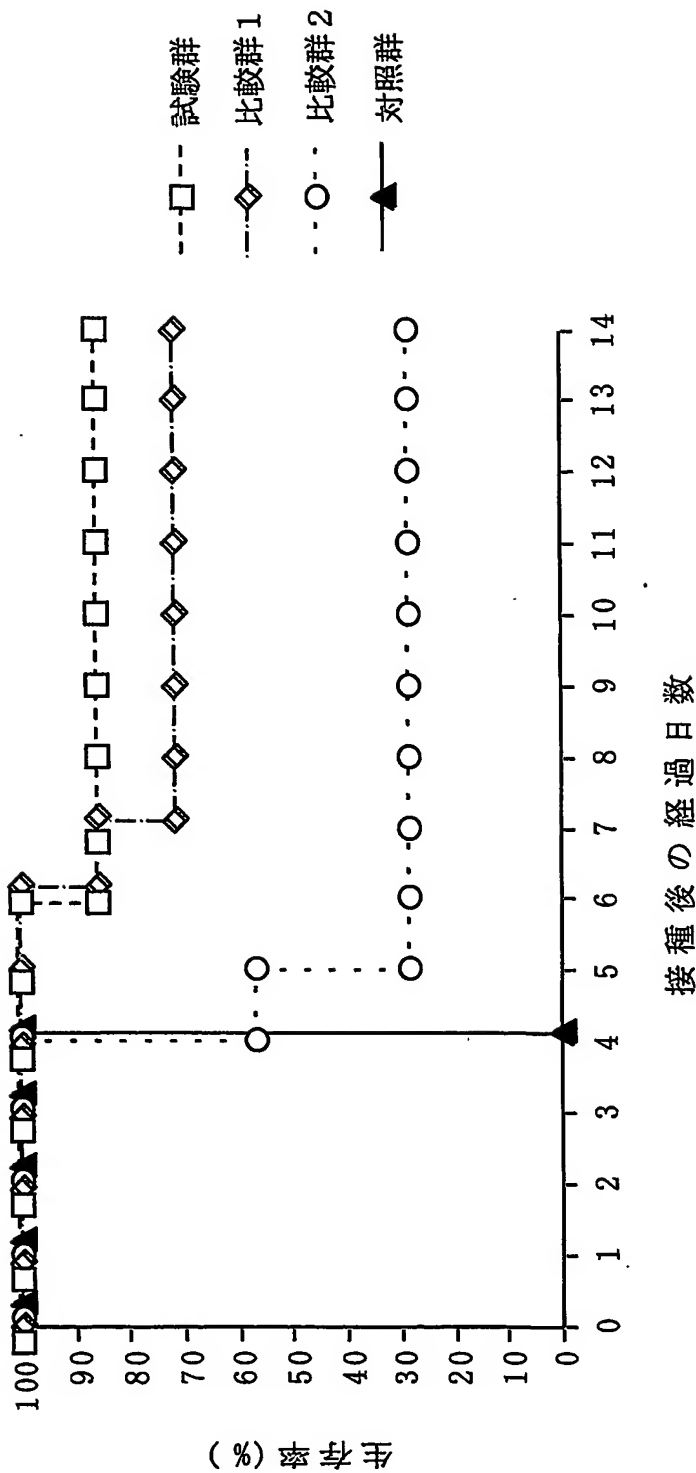


図 2

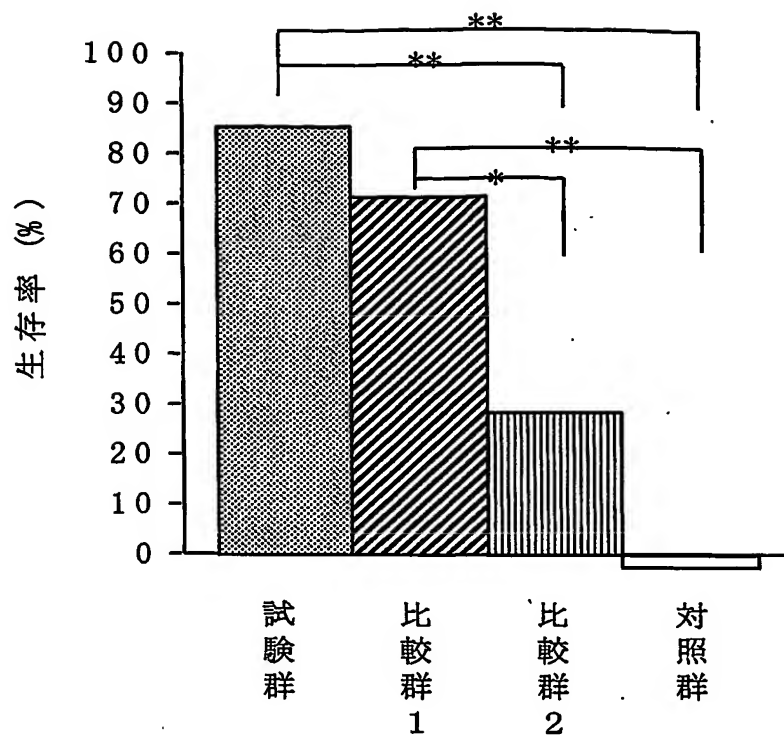


図 3

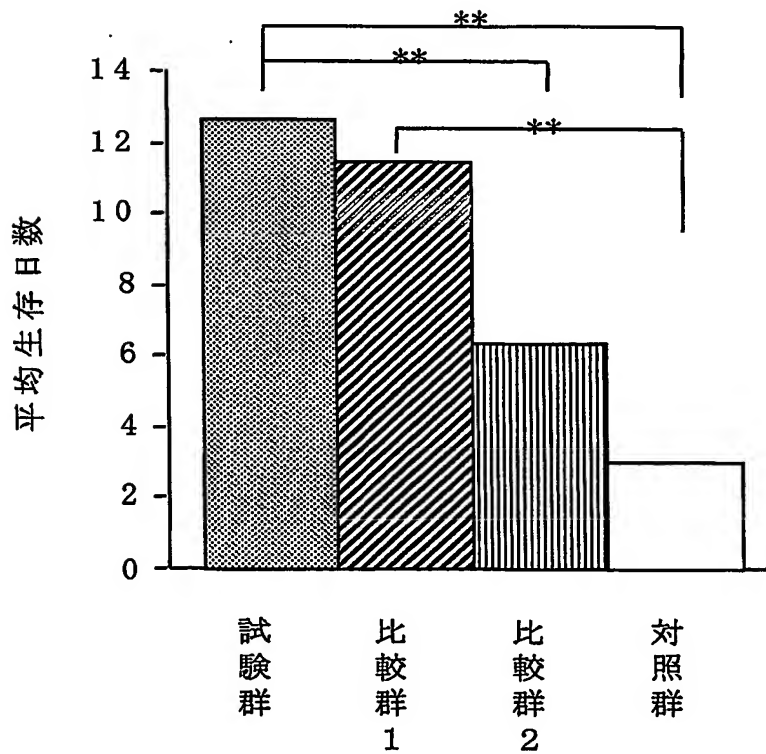


図 4

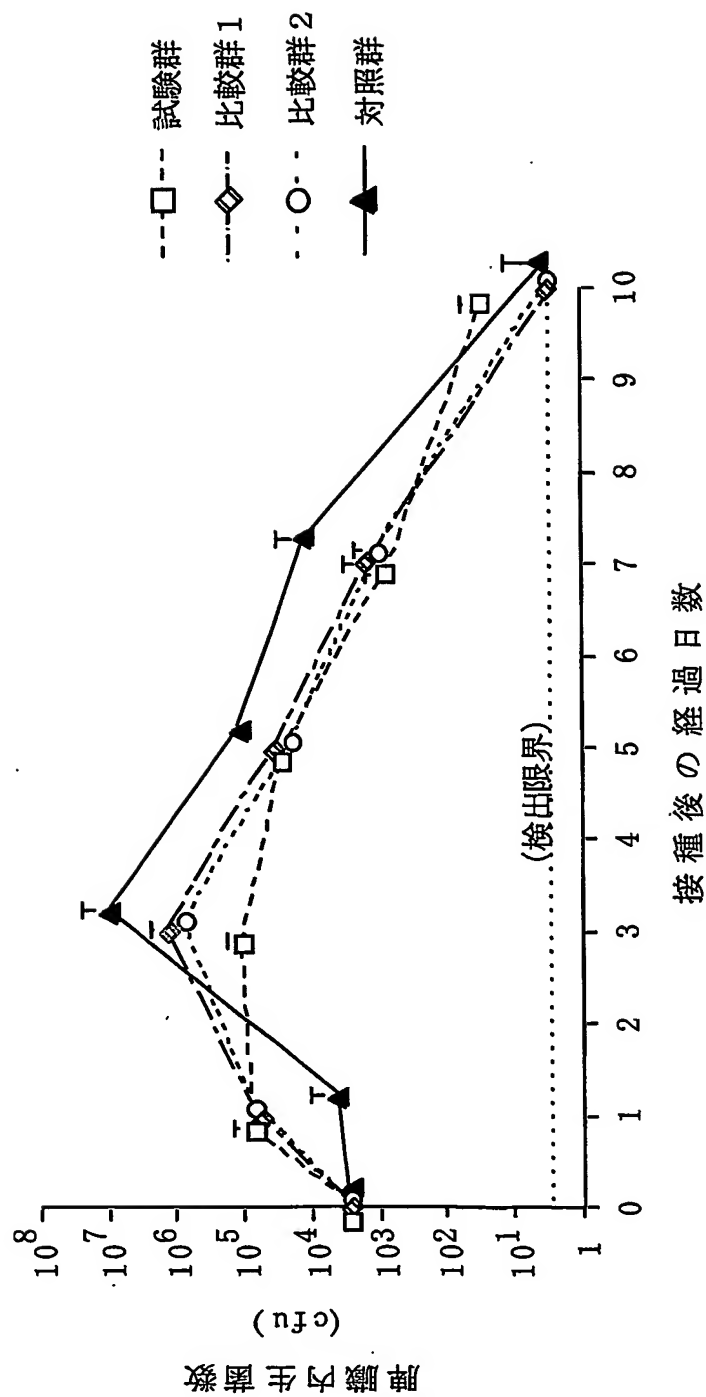


図 5

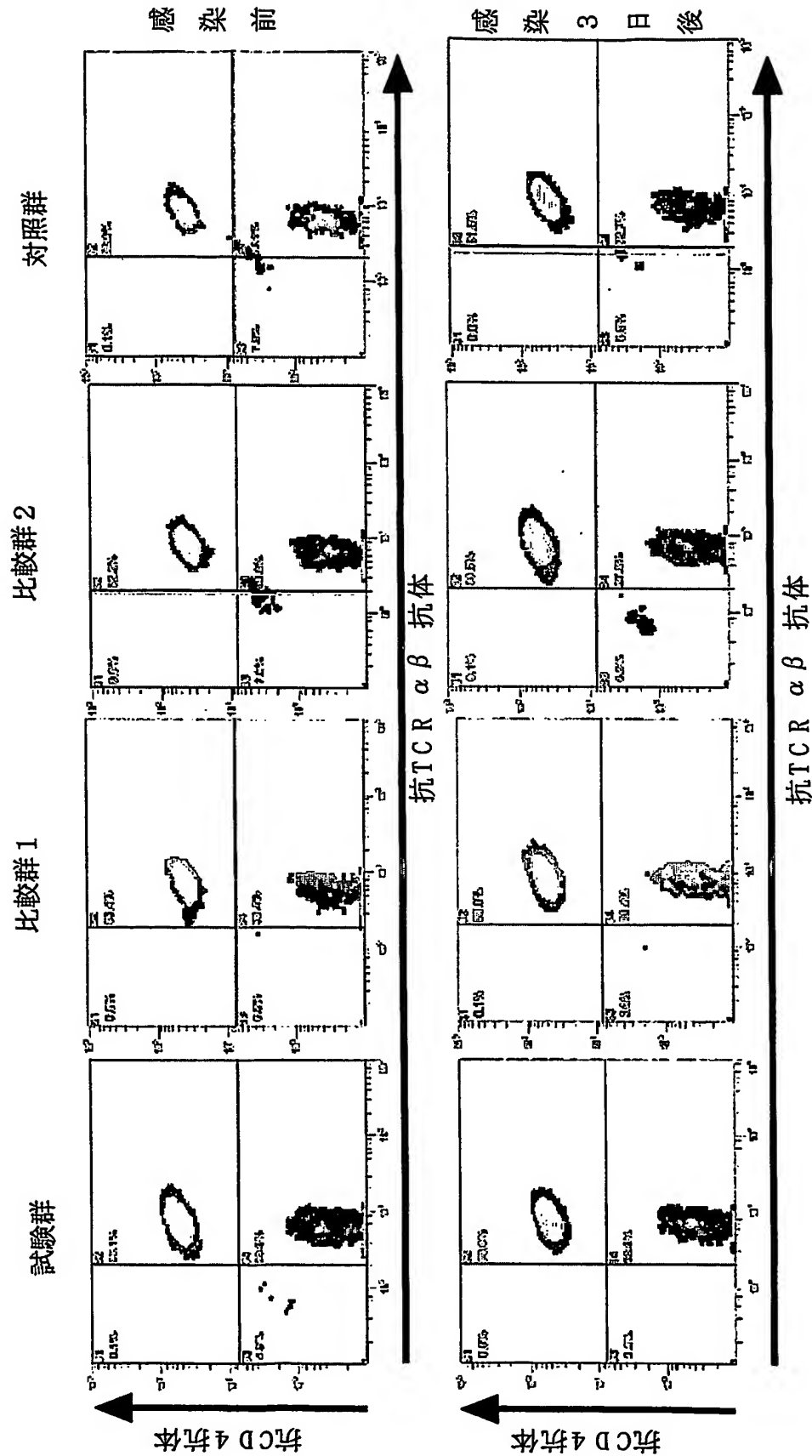


図 6

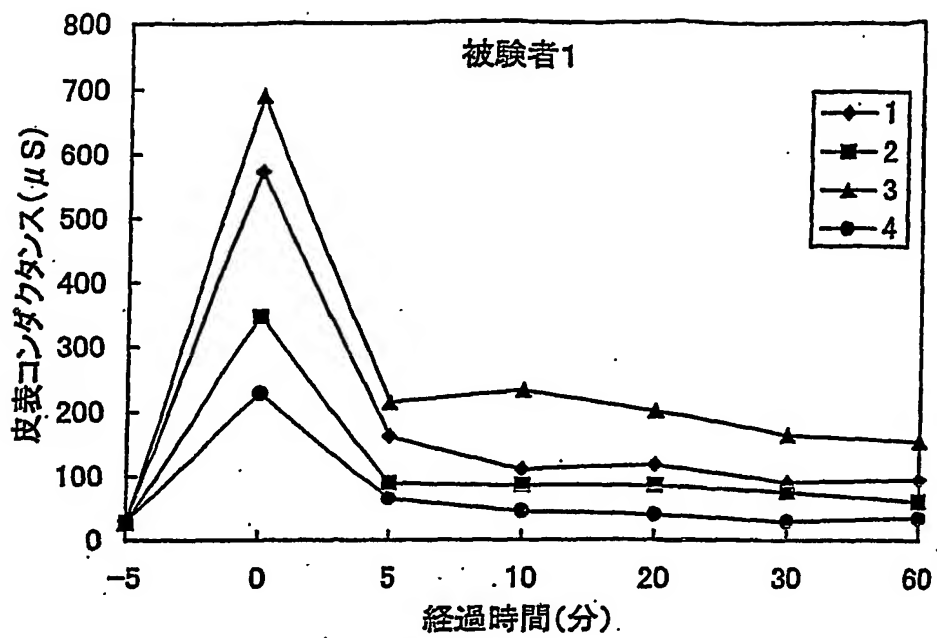


図 7

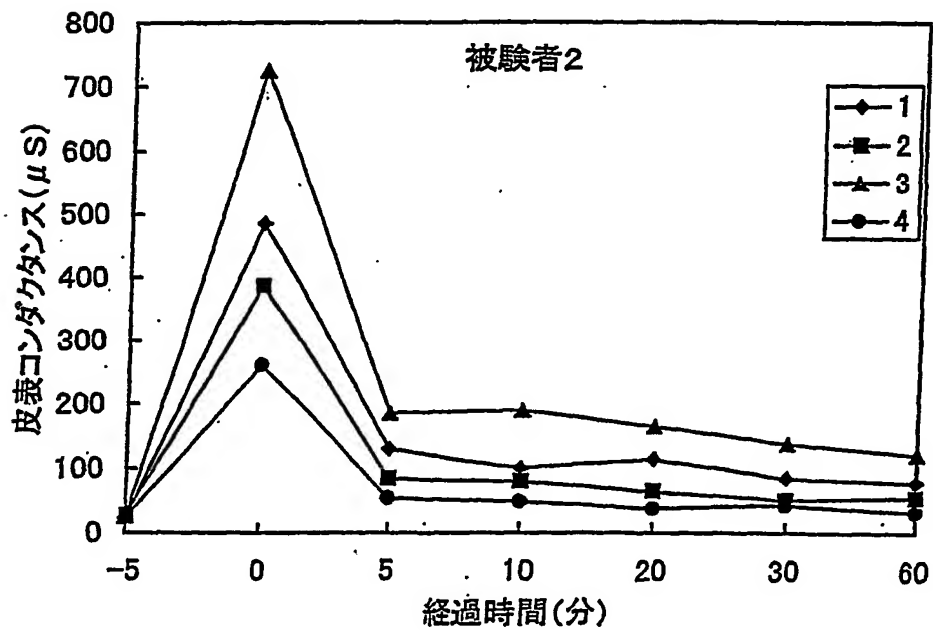


図 8

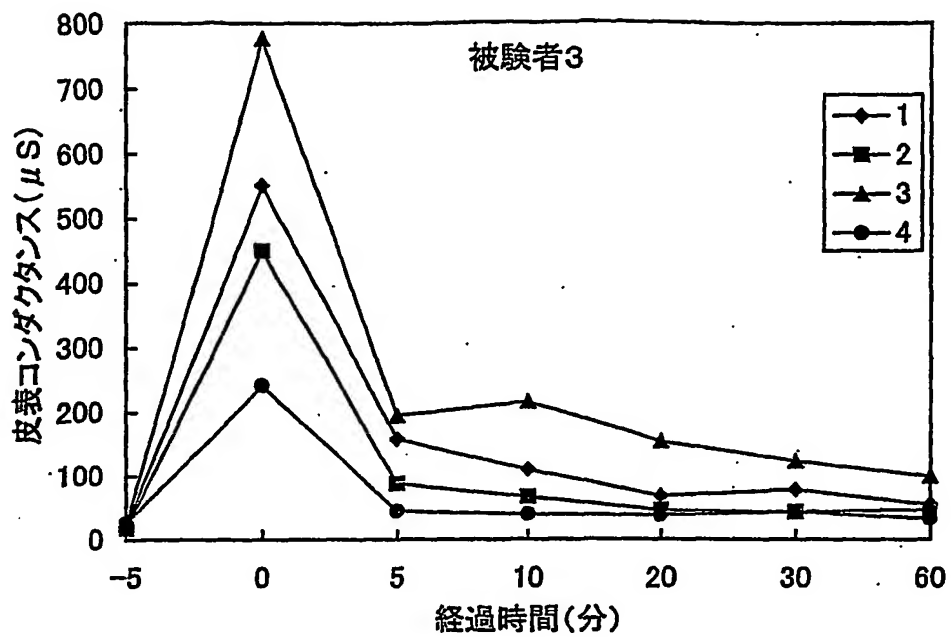


図 9

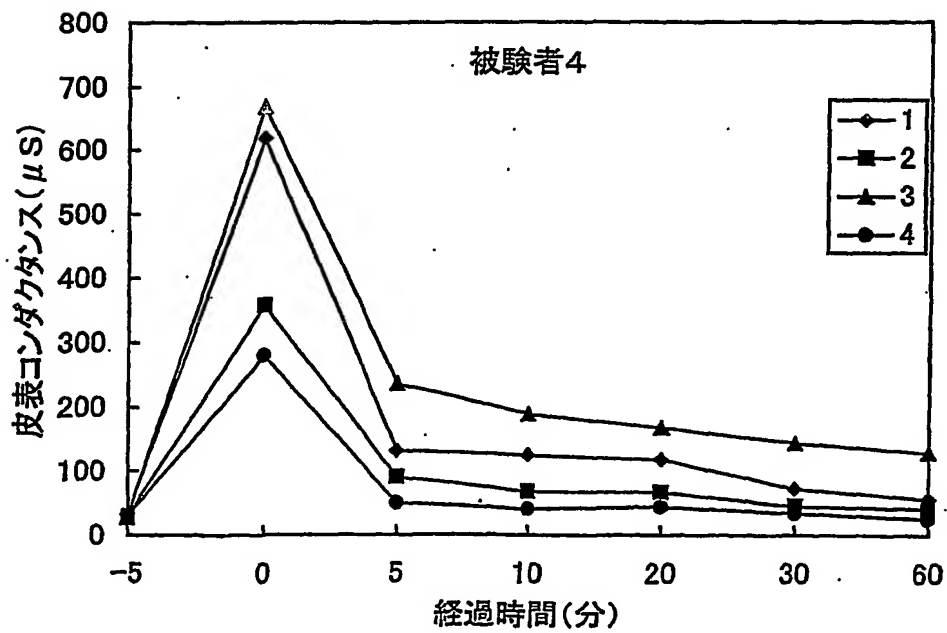
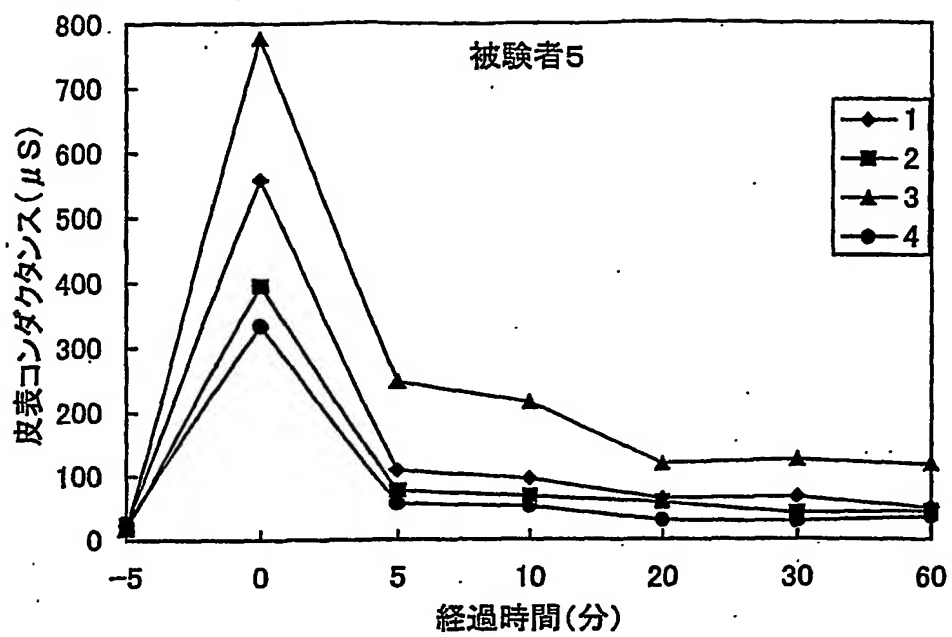


図 10



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002780

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K35/74, A61K31/716, A61K7/48, A61K7/00, A61P1/10, A61P37/04, A61P17/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K35/74, A61K31/716, A61K7/48, A61K7/00, A61P1/10, A61P37/04, A61P17/

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAP (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	JP 2004-121192 A (Katsunori KODAMA), 22 April, 2004 (22.04.04), Full text (Family: none)	1-3, 5, 6
X Y	JP 2003-40785 A (Combi Corp.), 13 February, 2003 (13.02.03), Full text; Claims 1, 3, 7; examples 1 to 3 & CN 1386510 A & KR 2002/89149 A	1-7 8
Y	JP 2002-238494 A (Sunstar Inc.), 27 August, 2002 (27.08.02), Full text; Claims; Par. Nos. [0030] to [0034]; test examples 4, 5 (Family: none)	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 May, 2004 (13.05.04)

Date of mailing of the international search report
01 June, 2004 (01.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002780

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-323001 A (Asahi Denka Kogyo Kabushiki Kaisha), 20 November, 2001 (20.11.01), Full text; Claim 8; test example 2 (Family: none)	1-8
Y	WO 98/26787 A1 (ARNOTT'S BISCUITS LTD.), 25 June, 1998 (25.06.98), Full text; Claims; page 2, lines 4 to 12; examples & AU 9853961 B & JP 2001-506129 A	1-8
Y	JP 2002-531510 A (N.V. Nutricia), 24 September, 2002 (24.09.02), Full text; Claim 3; example 4 & WO 00/33854 A1 & AU 2000/18966 B & EP 1137424 A1	1-8
Y	JP 2001-354570 A (Ichimaru Pharco Co., Ltd.), 25 December, 2001 (25.12.01), Full text; Claim 4; Par. No. [0055] (Family: none)	1-8
Y	JP 2001-231589 A (Kabushiki Kaisha Sofi), 28 August, 2001 (28.08.01), Full text; Claims (Family: none)	1-8
Y	JP 1-137990 A (Daiichi Togyo Kabushiki Kaisha), 30 May, 1989 (30.05.89), Full text; Claims (Family: none)	1-8
Y	JP 61-146192 A (Satoshi SHINOHARA), 03 July, 1986 (03.07.86), Full text; Claims; pages 1, lower right column (Family: none)	1-8
Y	JP 10-310515 A (Tomoko MIKI), 24 November, 1998 (24.11.98), Full text (Family: none)	8
Y	JP 62-205008 A (Kabushiki Kaisha Bio Bai Daimaru), 09 September, 1987 (09.09.87), Full text (Family: none)	8
Y	JP 2001-48796 A (Kabushiki Kaisha Advance), 20 February, 2001 (20.02.01), Full text (Family: none)	4-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K35/74, A61K31/716, A61K7/48, A61K7/00, A61P1/10, A61P37/04, A61P17/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K35/74, A61K31/716, A61K7/48, A61K7/00, A61P1/10, A61P37/04, A61P17/

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAP (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	JP 2004-121192 A (児玉克憲) 2004.04.22 文献全体 (ファミリーなし)	1-3, 5, 6
X Y	JP 2003-40785 A (コンビ株式会社) 2003.02.13 文献全体、請 求項1, 3, 7、実施例1-3 & CN 1386510 A & KR 2002/89149 A	1-7 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.05.2004

国際調査報告の発送日

01.6.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保元浩

4 C

8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2002-238494 A (サンスター株式会社) 2002.08.27 文献全体、特許請求の範囲、【0030】 - 【0034】、試験例4, 5 (ファミリーなし)		1-8
Y	JP 2001-323001 A (旭電化工業株式会社) 2001.11.20 文献全体、請求項 8、試験例 2 (ファミリーなし)		1-8
Y	WO 98/26787 A1 (ARNOTT'S BISCUITS LTD) 1998.06.25 文献全体、claims、p.2第4-12行、EXAMPLES & AU 9853961 B & JP 2001-506129 A		1-8
Y	JP 2002-531510 A (エヌ・ヴィ・ヌートリシア) 2002.09.24 文献全体、請求項 3、例 4 & WO 00/33854 A1 & AU 2000/18966 B & EP 1137424 A1		1-8
Y	JP 2001-354570 A (一丸ファルコス株式会社) 2001.12.25 文献全体、請求項 4、【0055】 (ファミリーなし)		1-8
Y	JP 2001-231589 A (株式会社ソフィ) 2001.08.28 文献全体、特許請求の範囲 (ファミリーなし)		1-8
Y	JP 1-137990 A (第一糖業株式会社) 1989.05.30 文献全体、特許請求の範囲 (ファミリーなし)		1-8
Y	JP 61-146192 A (篠原智) 1986 07.03 文献全体、特許請求の範囲、p.1右下欄 (ファミリーなし)		1-8
Y	JP 10-310515 A (三枝智子) 1998.11.24 文献全体 (ファミリーなし)		8
Y	JP 62-205008 A (株式会社バイオ・バイ・ダイマル) 1987.09.09 文献全体 (ファミリーなし)		8
Y	JP 2001-48796 A (株式会社アドバンス) 2001.02.20 文献全体 (ファミリーなし)		4-8